

CE

EnVision™ G|2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red)

Nº de catálogo K5361

2ª edición

Para su uso con anticuerpos primarios de conejo y de ratón. Para 150 pruebas.

Índice

Uso previsto

Para uso diagnóstico in vitro.

EnVision™ G|2 Doublestain System está indicado para su uso en inmunocitoquímica con anticuerpos primarios de ratón o de conejo de Dako para la detección de antígenos en tejidos fijados con formol e incluidos en parafina o frotis celulares fijados. Este sistema de visualización está diseñado para la detección simultánea de dos antígenos distintos dentro de una sola muestra. El sistema puede utilizarse en procedimientos manuales o con Dako Autostainer instruments.

La interpretación de los resultados debe realizarla un anatomopatólogo cualificado en el contexto de la historia clínica del paciente y otras pruebas diagnósticas.

Resumen y explicación

EnVision™ G|2 Doublestain System es un kit de visualización EnVision™ de segunda generación. Este sistema es útil para la detección simultánea de dos antígenos presentes en concentraciones bajas en una sola muestra. La visualización está basada en la peroxidasa (HRP) empleando DAB+ como cromógeno y en la fosfatasa alcalina (AP) con Permanent Red como cromógeno. Este sistema no contiene biotina, por lo que se reduce significativamente la tinción inespecífica derivada de la actividad endógena de la avidina-biotina.

Consulte las *Instrucciones generales para la tinción inmunohistoquímica* de Dako o las instrucciones del sistema de detección de los procedimientos de IHC para: 1) Principio del procedimiento, 2) Material necesario pero no suministrado, 3) Almacenamiento, 4) Preparación de la muestra, 5) Procedimiento de tinción, 6) Control de calidad, 7) Solución de problemas, 8) Interpretación de la tinción y 9) Limitaciones generales.

Principios del procedimiento

El procedimiento consiste en una tinción doble secuencial en la que el primer antígeno se visualiza mediante HRP/DAB+ y el segundo antígeno mediante AP/Permanent Red. El uso del Dual Endogenous Enzyme Block inhibe la actividad de la fosfatasa alcalina endógena, de la peroxidasa y de la pseudoperoxidasa presente en algunos tejidos. Tras el bloqueo de las enzimas endógenas, el primer paso consiste en la incubación de la muestra con un anticuerpo primario de ratón o de conejo diluido adecuadamente, seguido por la incubación con el reactivo Polymer/HRP. Este reactivo es un polímero de dextrano conjugado con HRP, que también está recubierto de anticuerpos frente a las inmunoglobulinas de conejo y de ratón. La reacción se visualiza mediante el cromógeno DAB+. Tras el paso de bloqueo con el reactivo Doublestain Block, la muestra se incuba con un segundo anticuerpo primario de ratón o de conejo diluido adecuadamente. En el siguiente paso se añade Rabbit/Mouse (LINK), un polímero de dextrano con anticuerpos frente a las inmunoglobulinas de conejo y de ratón, seguido por la incubación con el reactivo Polymer/AP. El Permanent Red Chromogen permite visualizar la segunda reacción. Todos los reactivos específicos, excepto los anticuerpos primarios, se incluyen en el kit.

Reactivos

Reactivos suministrados

Los materiales abajo indicados son suficientes para realizar 150 ensayos. El número de los ensayos se basa en el uso de 200 µL de cada reactivo por ensayo:

Vial 1 3 x 11 mL

DUAL ENDOGENOUS ENZYME BLOCK

Dual Endogenous Enzyme Block

Listo para su uso.
Solución de bloqueo enzimático endógeno, que contiene 0,5% de peróxido de hidrógeno, detergentes, inhibidores enzimáticos y conservante, pH 2.

Vial 2 3 x 11 mL

POLYMER/HRP

Polymer/HRP

Listo para su uso.
Polímero de dextrano conjugado con peroxidasa de rábano e inmunoglobulinas aisladas por afinidad. Se suministra en tampón Tris-HCl que contiene proteína estabilizante y conservante.

Vial 3 3 x 11 mL

DAB+ SUBSTRATE BUFFER

DAB+ Substrate Buffer

Solución de tampón sustrato, pH 7,5 que contiene <0,1% de peróxido de hidrógeno, estabilizantes, estimuladores y un agente antimicrobiano.

Vial 4 1 x 1,5 mL

DAB+ CHROMOGEN

DAB+ Chromogen

5% de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina en solución cromogénica.

Vial 5 3 x 11 mL

DOUBLESTAIN BLOCK

Doublestain Block

Listo para su uso.
Solución inhibidora.

Vial 6 3 x 11 mL

RABBIT/MOUSE (LINK)

Rabbit/Mouse (LINK)

Listo para su uso.
Polímero de dextrano unido a anticuerpos secundarios frente a inmunoglobulinas de conejo y de ratón. En solución tamponada que contiene proteína estabilizante y conservante.

Vial 7 3 x 11 mL

POLYMER/AP

Polymer/AP

Listo para su uso.
Polímero de dextrano conjugado con fosfatasa alcalina e inmunoglobulinas aisladas por afinidad. Se suministra en tampón Tris-HCl que contiene proteína estabilizante y un conservante.

Vial 8 3 x 11 mL

PERMANENT RED SUBSTRATE BUFFER

Permanent Red Substrate Buffer

Solución de tampón sustrato.

Vial 9 1 x 300 µL PERMANENT RED CHROMOGEN

Permanent Red Chromogen
Solución Permanent Red Chromogen.

Material necesario pero no suministrado

Paños absorbentes
Agua amoniacal, 37 mmol/L (opcional)
Antibody Diluent, nº de catálogo Dako S0809 o S2022
Contratinción; hematoxilina, como Mayer's Hematoxylin de Dako basada en agua, nº de catálogo S3309.
Cubreobjetos
Dako Autostainer instrument (opcional)
Anticuerpos primarios de Dako y reactivos de control negativo.
Agua destilada o desionizada
Epitope Retrieval Solution
Etanol, 95% y 70%
Cámara húmeda (opcional)
Microscopio (aumento de 20-800x)
Medios de montaje, como Dako Glycergel™ Mounting Medium, nº de catálogo C0563, Dako Faramount, Aqueous Mounting Medium, Ready-to-Use, nº de catálogo S3025, o medio de montaje no acuoso permanente, nº de catálogo Dako S3026.
Tejidos positivos y negativos para su uso como controles del procedimiento
Portaobjetos, SuperFrost Plus, recubiertos con poli-L-lisina o Dako Silanized Slides, nº de catálogo S3003.
Baños o recipientes de tinción
Cronómetro (capaz de medir intervalos de 2-40 minutos)
Frascos de lavado
Wash Buffer, nº de catálogo Dako S3006
Baño maría con tapa
Xileno, tolueno o sustitutos de xileno

Precauciones

1. Para usuarios profesionales.
2. El vial 2, Polymer/HRP, el vial 6, Rabbit/Mouse (LINK), y el vial 7, Polymer/AP, contienen material de origen animal. Al igual que con cualquier producto de origen biológico, deberán aplicarse los procedimientos de manipulación adecuados.
3. No exponga el vial 3, DAB+ Chromogen, el vial 9, Permanent Red Chromogen, o las DAB+ Working Solution o Permanent Red Working Solution preparadas, a luz intensa.
4. El vial 4, DAB+ Chromogen, contiene 1-5% de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (tetracloruro de bifenil-3,3',4,4'-tetrailtetraamonio) está etiquetado como:
   Nocivo.
   R40 Posibles efectos cancerígenos.
   R43 Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.
   R68 Posibilidad de efectos irreversibles.
   S35 Elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.
   S36/37 Úsense indumentaria y guantes de protección adecuados.

   El vial 9, Permanent Red Chromogen, contiene sal Fast Red KL y está etiquetado como:
   Tóxico.
   R45 Puede causar cáncer.
   S35 Elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.
   S45 En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstrele la etiqueta).

S53 Evítese la exposición – recábense instrucciones especiales antes del uso.

Precaución: Este producto contiene una sustancia que no se ha analizado totalmente. Esta clasificación se ha realizado tomando exclusivamente como base una comparación con sustancias con estructuras similares.

Como regla general, los menores de edad no pueden manipular este producto. Debe informarse debidamente a los usuarios acerca del procedimiento adecuado de trabajo, las propiedades peligrosas del producto y las instrucciones de seguridad necesarias. Le rogamos que consulte la hoja de datos de seguridad (MSDS) para obtener información más detallada.

5. Este producto contiene azida sódica (NaN_3), un compuesto químico altamente tóxico en su forma pura. En la concentración en la que se encuentra en el producto, aunque no está clasificada como peligrosa, la azida sódica puede reaccionar con el cobre o el plomo de las cañerías para formar acumulaciones de azidas metálicas altamente explosivas. Una vez desechado, deje correr abundante cantidad de agua para evitar acumulaciones de azidas metálicas en las cañerías.
6. Utilice el equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel.
7. La solución no utilizada debe desecharse con arreglo a las normativas locales, provinciales y nacionales.

Almacenamiento

Almacene el kit a una temperatura de 2-8 °C. No utilice el producto después de la fecha de caducidad impresa en el kit. No intercambie componentes del kit de lotes diferentes. Si los reactivos se almacenan bajo condiciones diferentes a las especificadas, dichas condiciones deben ser verificadas por el usuario. Si observa una tinción inesperada que no puede explicarse por variaciones en los procedimientos del laboratorio y sospecha de la existencia de un problema con el producto, póngase en contacto con nuestros servicios técnicos.

Preparación de las muestras

El kit puede utilizarse en cortes de tejidos fijados con formol e incluidos en parafina o frotis de células fijados. Pueden utilizarse diferentes agentes de fijación para la conservación de las muestras. Deberán emplearse los métodos habituales de procesamiento de tejidos para la tinción inmunocitoquímica con todos los cortes de tejido (1). El grosor adecuado de los cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina y de los cortes congelados es de 4-6 µm. La muestra debe montarse en portaobjetos para microscopio. Los cortes deben montarse en los portaobjetos lo más planos y estirados que sea posible. Si están demasiado arrugados, influirán negativamente en los resultados de la tinción.

NOTA: Para su uso en Dako Autostainer instruments, los portaobjetos no deben superar un ancho de 26 mm con el fin de que ajusten en el soporte para portaobjetos.

Los cortes incluidos en parafina deben montarse desde un baño maría precalentado que contenga agua destilada o desionizada. El baño maría no debería contener aditivos (como gelatina, poli-L-lisina, etc.). Los cortes deben secarse por calor, generalmente a una temperatura < 60 °C durante al menos 60 minutos (por ejemplo, durante una noche). Con el fin de asegurar una adherencia adecuada de los cortes a los portaobjetos, es importante secar el agua de debajo de los cortes antes del proceso de secado en el horno.

Procedimiento

A. Preparación de los reactivos

A.1 DAB+ Working Solution

Se prepara la DAB+ Working Solution mezclando bien 1 mL de DAB+ Substrate Buffer (vial 3) con 1 gota (25-30 µL) de DAB+ Chromogen (vial 4). Una alícuota de 1 mL es suficiente para 10 cortes de tejido. Prepare sólo el volumen necesario para el número de portaobjetos que se van a teñir. La solución DAB+ Working Solution preparada se mantiene estable durante aproximadamente 5 días si se almacena a una temperatura de 2–8 °C. Esta solución debe mezclarse bien antes de su uso. Cualquier precipitado que se forme en la solución en un plazo de 5 días no afecta a la calidad de la tinción. La DAB+ Working Solution debe prepararse en un Autostainer Reagent Vial cuando se utiliza en el Dako Autostainer instrument.

A.2 Permanent Red Working Solution

Se prepara la Permanent Red Working Solution mezclando bien 100 partes de Permanent Red Substrate Buffer (vial 8) con 1 parte de Permanent Red Chromogen (vial 9). Por ejemplo, mezcle 1 mL de Permanent Red Substrate Buffer (vial 8) con 10 µL de Permanent Red Chromogen (vial 9). Prepare sólo el volumen necesario para el número de portaobjetos que se van a teñir. Utilice la solución en los 30 minutos siguientes. La Permanent Red Working Solution debe prepararse en un Autostainer Reagent Vial cuando se utiliza en el Dako Autostainer instrument.

A.3 Instrucciones para la dilución óptima de los anticuerpos primarios

EnVision™ G|2 Doublestain System es compatible con anticuerpos primarios concentrados de Dako diluidos adecuadamente. El usuario debe determinar la dilución óptima.

B. Procedimiento de tinción para uso manual

B.1 Notas sobre el procedimiento

Los siguientes pasos de pretratamiento deben realizarse antes de utilizar el EnVision™ G|2 Doublestain System con cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina. Se debe eliminar la parafina y rehidratar la muestra. Algunas muestras deben someterse al desenmascaramiento del epítopo mediante la recuperación del epítopo inducida por calor o digestión enzimática. Consulte el folleto informativo del anticuerpo primario individual para obtener información específica acerca de la preparación de las muestras. Después del desenmascaramiento, la muestra debe enjuagarse suavemente con solución de tampón de lavado de un frasco de lavado (no dirija el flujo directamente sobre el tejido) y colocarse durante 5 minutos en un baño de tampón de lavado recién preparado.

Los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de la inmunotinción. De la misma manera, las incubaciones deben realizarse a temperatura ambiente.

No deje que las muestras se sequen durante el procedimiento de tinción. Las muestras secas pueden causar un aumento de la tinción inespecífica.

B.2 Protocolo de tinción

Paso 1: Vial 1, Dual Endogenous Enzyme Block

Elimine el exceso de tampón de lavado y limpie con cuidado alrededor de la muestra para eliminar cualquier resto de líquido y mantener el reactivo en la zona requerida. Aplique 200 µL de Dual Endogenous Enzyme Block para cubrir la muestra. Incúbela durante 5 (± 1) minutos. Enjuague suavemente la muestra con solución de tampón de lavado de un frasco de lavado (no dirija el flujo directamente sobre el tejido) y colóquela durante 5 minutos en un baño de tampón de lavado recién preparado.

Paso 2: Anticuerpo primario nº 1 o reactivo de control negativo nº 1
Elimine el exceso de tampón de lavado y limpie los portaobjetos de la forma antes descrita. Aplique 200 µL de anticuerpo primario de ratón o conejo o de reactivo de control negativo (véase la sección A.3) para cubrir la muestra. Incúbela durante 10 (± 1) minutos. Enjuague la muestra de la forma descrita en el paso 1.

Paso 3: Vial 2, Polymer/HRP
Elimine el exceso de tampón de lavado y limpie los portaobjetos de la forma antes descrita. Aplique 200 µL de Polymer/HRP para cubrir la muestra. Incúbela durante 10 (± 1) minutos. Enjuague dos veces la muestra de la forma descrita en el paso 1.

Paso 4: DAB+ Working Solution
Prepare la DAB+ Working Solution de la forma descrita en la sección A.1.

Elimine el exceso de tampón de lavado y limpie los portaobjetos de la forma antes descrita. Aplique 200 µL de DAB+ Working Solution para cubrir la muestra. Incúbela durante 5-15 minutos. Los tiempos de incubación óptimos pueden variar y deberán determinarse en cada laboratorio en particular. Enjuague ligeramente la muestra con agua destilada o desionizada de una botella de lavado (no apunte el chorro directamente sobre el tejido). Recoja los residuos de la DAB+ Working Solution en un recipiente para materiales peligrosos para su correcta eliminación. Si el procedimiento de tinción se ha de interrumpir, los portaobjetos se pueden mantener en un baño de de tampón de lavado después de la incubación de la DAB+ Working Solution hasta 1 hora a temperatura ambiente (20-25 °C) sin modificar el resultado de la tinción.

Paso 5: Vial 5, Doublestain Block
Elimine el exceso de tampón de lavado y limpie los portaobjetos de la forma antes descrita. Aplique 200 µL de Doublestain Block para cubrir la muestra. Incúbela durante 3 (± 1) minutos. Enjuague la muestra de la forma descrita en el paso 1.

Paso 6: Anticuerpo primario nº 2 o reactivo de control negativo nº 2
Elimine el exceso de tampón de lavado y limpie los portaobjetos de la forma antes descrita. Aplique 200 µL de anticuerpo primario de ratón o conejo diluido adecuadamente o de reactivo de control negativo (véase la sección A.3) para cubrir la muestra. Incúbela durante 10 (± 1) minutos. Enjuague la muestra de la forma descrita en el paso 1.

Paso 7: Vial 6, Rabbit/Mouse (LINK)
Elimine el exceso de tampón de lavado y limpie los portaobjetos de la forma antes descrita. Aplique 200 µL de Rabbit/Mouse (LINK) para cubrir la muestra. Incúbela durante 10 (± 1) minutos. Enjuague dos veces la muestra de la forma descrita en el paso 1.

Paso 8: Vial 7, Polymer/AP
Elimine el exceso de tampón de lavado y limpie los portaobjetos de la forma antes descrita. Aplique 200 µL de Polymer/AP para cubrir la muestra. Incúbela durante 10 (± 1) minutos. Enjuague dos veces la muestra de la forma descrita en el paso 1.

Paso 9: Permanent Red Working Solution
Prepare la Permanent Red Working Solution de la forma descrita en la sección A.2. La Permanent Red Working Solution preparada debe utilizarse en los 30 minutos siguientes.

Elimine el exceso de tampón y limpie los portaobjetos de la forma antes descrita. Aplique 200 µL de Permanent Red Working Solution para cubrir la muestra. Incúbela durante 5-20 minutos. Los tiempos de incubación óptimos pueden variar y deberán determinarse en cada laboratorio en particular. Enjuague ligeramente los portaobjetos con agua destilada o desionizada de una botella de lavado (no apunte el chorro directamente sobre la muestra). Recoja los residuos que contengan cromógeno en un recipiente para desechos peligrosos para eliminarlos de forma adecuada. Ponga durante 5 minutos los portaobjetos enjuagados en un baño maría de agua destilada o desionizada recién preparado.

Paso 10: Contratinción (instrucciones para la hematoxilina)
Sumerja los portaobjetos en un baño de hematoxilina. La duración de la incubación depende de la potencia de la hematoxilina utilizada. Después de la contratinción con hematoxilina, enjuague bien en agua destilada o desionizada.

Opcional: Sumerja los portaobjetos con tejido en un baño de 37 mmol/L de agua amoniacal y enjuáguelos suavemente en agua destilada o desionizada durante 2-5 minutos. El agua amoniacal (37 mmol/L) se prepara mezclando 2,5 mL de 15 mol/L de hidróxido de amonio (concentrado) con 1 litro de agua destilada o desionizada. El agua de amonio de 37 mmol/L no utilizado puede almacenarse a temperatura ambiente (20-25 °C) en un frasco bien cerrado durante 12 meses.

Paso 11: Montaje

Si se utilizan medios de montaje acuosos, se recomienda utilizar medios como Dako Glycergel™ Mounting Medium, nº de catálogo C0563 o Faramount Aqueous Mounting Medium, nº de catálogo S3025.

Para montajes no acuosos permanentes, se recomienda el uso de Dako Permanent Mounting Media, nº de catálogo S3026, tras haber dejado secar completamente los portaobjetos al aire.

C. Procedimiento de tinción para Dako Autostainer Instruments

Todos los reactivos del kit, con la excepción del vial 4 y del vial 9, se suministran con Autostainer Reagent Vials. La DAB+ Working Solution y la Permanent Red Working Solution deben prepararse en Autostainer Reagent Vials cuando se utilicen en el Dako Autostainer Instrument. EnVision™ G|2 Doublestain System se ha adaptado para su uso con los Dako Autostainer instruments de acuerdo con la plantilla abajo descrita.

Antes de la tinción de acuerdo con la plantilla de Dako Autostainer Instruments, le rogamos que lea atentamente el **Manual del usuario del Autostainer Instrument correspondiente.**

Antes de iniciar el Autostainer Instrument, deben introducirse los portaobjetos y los reactivos de acuerdo con el **Slide Layout Map** y **Reagent Layout Map.**

Los siguientes pasos de pretratamiento deben realizarse antes de utilizar el EnVision™ G|2 Doublestain System con cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina. Se debe eliminar la parafina y rehidratar la muestra. Algunas muestras deben someterse al desenmascaramiento del epítopo mediante la recuperación del epítopo inducida por calor o digestión enzimática. Consulte la sección A.3 y el folleto informativo del anticuerpo primario Dako individual para obtener información específica acerca de la preparación de las muestras. Después del desenmascaramiento, la muestra debe enjuagarse suavemente con solución de tampón de lavado de un frasco de lavado (no dirija el flujo directamente sobre el tejido) y colocarse durante 5 minutos en un baño de tampón de lavado recién preparado.

Los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de la inmunotinción. De la misma manera, las incubaciones deben realizarse a temperatura ambiente.

No deje que las muestras se sequen durante el procedimiento de tinción. Las muestras secas pueden causar un aumento de la tinción inespecífica.

Paso 1: Programación del Autostainer Instrument

Antes de la primera aplicación del EnVision™ G|2 Doublestain System en el Dako Autostainer Instrument, debe crearse una nueva plantilla. Consulte la plantilla abajo indicada y el Manual del usuario del Autostainer Instrument correspondiente.

Plantilla: K5361

1. Rinse Buffer
2. End.Enz. Block
3. Rinse Buffer
4. Primary Antibody
5. Rinse Buffer
6. Secondary Reagent
7. Rinse Buffer
8. Rinse Buffer
9. *Swtch
10. Substrate
11. Rinse Water
12. *Swtch
13. Auxiliary
14. Rinse Buffer
15. Primary Antibody
16. Rinse Buffer
17. Secondary Reagent
18. Rinse Buffer
19. Rinse Buffer
20. Tertiary Reagent
21. Rinse Buffer
22. Rinse Buffer
23. *Swtch
24. Substrate-Batch
25. Rinse Water
26. *Swtch

NOTA: Antes de cargar los portaobjetos de acuerdo con la **PROGRAM STAINING RUN SCREEN**, deben añadirse a la lista de reactivos los siguientes reactivos. Le rogamos que consulte la Tabla 1 para obtener el nombre, el paso de la plantilla y el tiempo de incubación, y el Manual del usuario del Autostainer Instrument correspondiente.

Tabla 1. Modificaciones necesarias de la lista de reactivos

Reactivo	**Código**	**Paso de la plantilla**	**Tiempo de incubación**
Dual Endogenous Enzyme Block	K5361	End. Enz. Block (Bloq. Enz. End.)	5 minutos
Los anticuerpos primarios no están todavía en la lista del Autostainer	Individual	Primary Antibody (Anticuerpo primario)	10 minutos
Polymer/HRP	K5361	Secondary Reagent (Reactivo secundario)	10 minutos
DAB+ Working Solution	K5361	Substrato	10 minutos
Doublestain Block	K5361	Auxiliar	3 minutos
Los anticuerpos primarios no están todavía en la lista del Autostainer	Individual	Anticuerpo primario	10 minutos
Rabbit/Mouse (LINK)	K5361	Secondary Reagent (Reactivo secundario)	10 minutos
Polymer/AP	K5361	Tertiary Reagent (Reactivo terciario)	10 minutos
Permanent Red Working Solution	K5361	Substrate-Batch (Lote del sustrato)	10 minutos

Paso 2: Protocolo de tinción

Cargue la plantilla (**K5361**) del kit de detección EnVision™ G|2 Doublestain System en la **PROGRAM STAINING RUN SCREEN**. Especifique el número de portaobjetos de la sesión y cargue los reactivos con los tiempos de incubación de la plantilla. La posición de los portaobjetos se mostrará en la **Slide Layout Map Screen** y la posición y el volumen del reactivo que debe cargarse en el Autostainer Instrument se mostrarán en la **Reagent Layout Map Screen**. Consulte también el Manual del usuario.

Antes de cargar los portaobjetos de acuerdo con la **Slides Layout Map Screen**, se recomienda mojar previamente los portaobjetos durante 5 minutos en el Tampón de lavado Dako, nº de catálogo S3006. Coloque los viales en la racleta de reactivos de acuerdo con el **Reagent Layout Map**. Tenga cuidado de cargar los reactivos y los volúmenes correctos. Preste especial atención a la carga de los viales con los anticuerpos primarios. Purgue el agua y las bombas de tampón. Inicie el programa. Después de que finalice el programa, enjuague los portaobjetos con agua destilada o desionizada. Para la contratinción y el montaje, consulte los pasos 10 y 11 de la sección B.2.

Interpretación de los resultados

El antígeno reconocido por el anticuerpo primario nº 1 se tiñe con el cromógeno DAB+. El uso del cromógeno DAB+ produce un producto final de color marrón. El antígeno reconocido por el anticuerpo primario nº 2 se tiñe con el cromógeno Permanent Red. El uso del cromógeno Permanent Red produce un producto final de color rojo. Ambos colores permiten su visualización frente a la contratinción con hematoxilina.

Si no hay presente ninguna tinción inespecífica, se reconocerá como una tinción difusa de color marrón o rojo en los portaobjetos tratados con el reactivo de control negativo.

Los núcleos se teñirán de color azul gracias a la contratinción con hematoxilina.

Referencias

1. Sheehan DC, HrAPchak BB. Theory and practice of histotechnology. St. Louis: CV Mosby Company; 1980

Explicación de los símbolos

REF	Referencia	2 °C 8 °C	Limitación de temperatura		Fecha de caducidad	T	Tóxico
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*	Σ	Contiene suficiente para <n> ensayos		Fabricante		
	Consulte las instrucciones de uso	LOT	Código del lote	Xn	Nocivo		

Fabricado por:
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup
Dinamarca
Tel. +45 44 85 95 00
Fax +45 44 85 95 95